

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 2001-013139

(43) Date of publication of application : 19. 01. 2001

(51) Int. Cl. G01N 33/532
G01N 33/543

(21) Application number : 11-182063 (71) Applicant : TOYOB0 CO LTD

(22) Date of filing : 28. 06. 1999 (72) Inventor : KONDO MOTOHIRO
TAKARADA YUTAKA
SEGAWA MASAYA

(54) IMMUNOLOGICAL MEASURING METHOD

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To realize a high-sensitivity immunological measuring method capable of detecting and quantitating an extremely small quantity of biological sample component simply and rapidly without damaging an antigen-antibody reaction, by using a nucleic acid amplification method not requiring a heat cycle.

SOLUTION: In this immunological measuring method by using a biological sample component obtained by labeling nucleic acid having an amplifiable base sequence and an antibody or an antigen having reactivity immunologically, the antibody or the antigen is reacted with the biological sample component, and thereafter a constant-temperature nucleic acid amplification reaction, such as an NASBA method, a 3SR method, an SDA method, a TMA method, a CPR method or the like, is executed by treating, as a target nucleic acid, the nucleic acid coupled in the obtained complex between the antibody or the antigen and the biological sample component. And, the amplified nucleic acid is detected to thereby detect or quantitate the biological sample component.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-13139

(P2001-13139A)

(43)公開日 平成13年1月19日(2001.1.19)

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N
33/532
33/543

識別記号

5 0 1

F I

G 0 1 N
33/532
33/543

テマコード(参考)

Z
5 0 1 D

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 6 頁)

(21)出願番号

特願平11-182063

(22)出願日

平成11年6月28日(1999.6.28)

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 近藤 元宏

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡
績株式会社総合研究所内

(72)発明者 宝田 裕

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡
績株式会社総合研究所内

(72)発明者 瀬川 昌也

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡
績株式会社総合研究所内

(54)【発明の名称】 免疫学的測定法

(57)【要約】

【課題】熱サイクルを必要としない核酸増幅法を用いることにより、抗原抗体反応を損なうことがなく、簡便かつ迅速で、しかも極めて微量の生体試料成分を検出及び定量することが可能な高感度な免疫測定法を提供する。

【解決手段】増幅されうる塩基配列を有する核酸が標識されてなる生体試料成分と免疫学的に反応性を有する抗体もしくは抗原を用いた免疫学的測定法であって、該抗体もしくは該抗原と生体試料成分とを反応せしめ、次いで得られた該抗体もしくは該抗原と該生体試料成分との複合体において結合される該核酸を標的核酸としてN A S B A法、3 S R法、S D A法、T M A法およびC P R法等の恒温核酸増幅反応を行い、増幅された該核酸を検出することにより生体試料成分を検出もしくは定量することを特徴とする免疫学的測定法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 増幅されうる塩基配列を有する核酸が標識されてなる生体試料成分と免疫学的に反応性を有する抗体もしくは抗原を用いた免疫学的測定法であって、該抗体もしくは該抗原と生体試料成分とを反応せしめ、次いで得られた該抗体もしくは該抗原と該生体試料成分との複合体において結合される該核酸を標的核酸として恒温核酸増幅反応を行い、増幅された該核酸を検出することにより生体試料成分を検出もしくは定量することを特徴とする免疫学的測定法。

【請求項2】 恒温核酸増幅反応が、NASBA法、3SR法、SDA法、TMA法およびPCR法よりなる群から選ばれたいずれかの方法により行われる請求項1記載の方法。

【請求項3】 核酸増幅反応および核酸検出反応とを同時にう請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 核酸配列が、1本鎖DNA、2本鎖DNA、1本鎖RNAよりなる群から選ばれたいずれかである請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 核酸配列が、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む核酸配列である請求項4記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、細菌、ウイルス、寄生虫等の感染疾患の診断、自己免疫疾患等の診断、組織適合抗原の検出、ホルモンの検出、ホルモン異常の診断、癌診断、食品中の細菌毒素の検出等において微量の生体試料から免疫学的方法により、試料成分を検出もしくは定量する免疫学的測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、生体試料成分の検出や測定に際しては、特異性の高い抗原抗体反応を利用した免疫測定法が好んで用いられている。この方法では、生体試料成分と免疫学的に反応する抗体または抗原を放射性物質や酵素などで標識し、最終的に反応した標識物を検出及び測定することにより目的成分の検出及び定量を行うが、これらの方法で通常用いられる標識物による検出及び測定の感度には理論的に限界があり、標識物の検出限界が目的成分の検出、測定の感度を定める最大要因となっている。しかも上記の検出限界は、例外的に感度の高い場合はあるが、実際にはある物質とそれに対する特異的結合性物質との親和性が、必ずしも満足できる程に高いとは限らないことが多い。

【0003】酵素免疫測定法では、アビシンービオチン系を用いた増幅方法が一般的であるが、ビオチン化あるいはアビシン化した標識物の非特異的な結合によるバックグラウンドが高くなり、感度が悪くなるという欠点がある。高感度化の操作のために特異性の非常に高い方法を採用することによって、バックグラウンドの干渉を抑

えることが求められるところである。

【0004】一方、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR法）は、鑄型となる特定のDNA領域に対して、その領域を挟むように2つのプライマーをアニールさせ、DNAポリメラーゼを用いた反応を繰り返すことによって、鑄型の領域を特異的に増幅する方法である（特開昭61-274697号公報）。この方法を利用すれば、特定領域を10万～100万倍に増幅をする事が可能であり、試験中の1DNA分子の存在でも検出が可能である事が報告されている〔リ（H. Li）らネイチャー（Nature、第335巻、414～417頁、1988）〕。そこで微量検体を用いた遺伝子診断、ウイルス診断、微生物検出等の利用が考案されている。しかしながら、PCR法はDNAやRNAのような核酸を検出する目的には非常に優れた方法であるが、核酸以外の物質を増幅することは不可能であり、これらの検出には適用されないといった欠点がある。

【0005】そこで、抗原抗体反応において、標識物として核酸を用い、抗原抗体反応せしめた後に核酸をPCR法を用いて、検出感度を高めることができること（immuno-PCR法）が報告されている（Sanoら、Science、Vol. 258、120-122、1992）。しかし、PCR反応を行う場合、核酸の変性、プライマーのアニール、プライマーの伸長という工程を経るため、熱変性サイクルが必要であり、その為に特別な機器が必要となってくる。さらには熱反応により、結合した抗原抗体反応が損なわれる欠点もある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、熱サイクルを必要としない核酸増幅法を用いることにより、抗原抗体反応を損なうことなく、極めて微量の生体試料成分を検出及び定量することが可能な免疫測定法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記事情に鑑み、銳意検討を行った結果、標識物の検出限界に由来する問題に対し、生体試料成分と反応性を有する抗原もしくは抗体を核酸により標識化し、抗原抗体反応を行った後に該核酸を恒温増幅法を用いて増幅することにより、簡便かつ迅速でしかも高感度な検出が可能となることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0008】すなわち、本発明は以下のよう構成から成る。

(1) 増幅されうる塩基配列を有する核酸が標識される生体試料成分と免疫学的に反応性を有する抗体もしくは抗原を用いた免疫学的測定法であって、該抗体もしくは該抗原と生体試料成分とを反応せしめ、次いで得られた該抗体もしくは該抗原と該生体試料成分との複合体において結合される該核酸を標的核酸として恒温核酸増幅反応を行い、増幅された該核酸を検出することにより

生体試料成分を検出もしくは定量することを特徴とする免疫学的測定法。

(2) 恒温核酸增幅反応が、NASBA法、3SR法、SDA法、TMA法およびCPR法よりなる群から選ばれたいずれかの方法により行われる(1)の方法。

(3) 核酸増幅反応および核酸検出反応と同時に(1)または(2)の方法。

(4) 核酸配列が、1本鎖DNA、2本鎖DNA、1本鎖RNAよりなる群から選ばれたいずれかである(1)～(3)のいずれかの方法。

(5) 核酸配列が、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む核酸配列である(4)の方法。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明において抗原抗体反応とは、具体的にはELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)であり、一般的なELISAにおける検出および測定の限界を飛躍的に向上させ、標識物の検出限界に由来する問題を解決するものである。即ち、ELISAで用いられる標識体を核酸とし、抗原抗体反応を行った後、核酸を恒温増幅することを特徴とする簡便かつ迅速な高感度検出法である。本発明は、標識物を用いたELISAの全てに適用されうるものであり、従来のELISA検出および定量による微量な生体試料成分の測定法の代わりに用いることが出来るものである。ここで、検出あるいは定量される生体試料中に、核酸を含んでいるか否かは問題とならない。該生体試料が核酸を含んでいる場合には、その核酸中に含まれない塩基配列を標識として用いれば良い。いずれの場合であっても、標識に用いた核酸は、オリゴヌクレオチドからキロ塩基単位の大きさのものまで利用可能であるが、抗原抗体反応の特異的結合を妨害しない程度の大きさであることが望ましい。

【0010】本発明において測定対象となる生体試料成分としては、血液、血清、血漿、リンパ液、尿、糞便、腹水、胸水、組織標本などが広く生体に由来するものが挙げられる。

【0011】本発明において、標識として用いられる核酸は、DNAでもRNAでもよく、さらには一本鎖でも二本鎖でもよい。しかし一本鎖のRNAは、被検液中あるいは増幅反応液中のRNase活性により、容易に分解されるので、一本鎖で用いる場合は一般的にDNAを使用するか、あるいは修飾ヌクレオチドで合成したRNase耐性のあるRNAの必要がある。二本鎖の場合はいずれでもよい。さらには、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含んでいても良い。

【0012】本発明において、核酸を標識する方法は、標識核酸を合成する際に、抗原または抗体と結合し得るように、予め修飾を加えておき、次に該標識物と被標識物を反応させて結合することにより行うのが好ましい。例えば、核酸の5'末端にSH基を導入し、予め被標識

物に導入しておいたマレイミド基と反応させることにより標識する方法が知られている(Innisら, PCR Protocols, Academic Press, 1990)。あるいは、上記SH基と生物学的成分のSH基を酸化することにより、ジスルフィド結合を形成させることも可能である。

【0013】アビジンーピオチンのような特異的かつ強い結合性を利用して、間接的に核酸を結合することも可能である。例えば、まず被標識物をピオチン化しておき、次にこの標識ピオチンに対して過剰のアビシンを結合させる。1分子のアビシンは4分子のピオチンと結合し得るが、アビシン過剰の条件下においては、標識ピオチンとアビシンが1対1の量比で結合し、被標識物質に結合したアビシンは、さらにピオチン3分子との結合能力を保持している。次に、予めピオチン化した核酸を反応させることによって、アビシンを介して核酸による標識が行うことができる。この方法では、抗原-抗体複合体を形成した後に、核酸による標識化が可能であるので、複合体の形成にはほとんど影響を与えることなく、大きな核酸分子でも標識として用いることが出来る。さらには、抗体を標識する場合、プロテインAとストレプトアビシンのキメラ蛋白を用いることも可能である(Sanoら、Science, Vol. 258, 120-122, 1992)。

【0014】さらには、本発明において、恒温核酸増幅法とは、一定の温度において、標識核酸をその固有の配列の相補性を利用して増幅する方法をいう。該核酸増幅法としては、特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、NASBA法(Nucleic acid sequence-based amplification Method:Nature 350, p91, 1991)、SDA法(Strand Displacement Amplification:Nucleic Acids Res. 20, p1691, 1992)、TMA法(Transcription Mediated Amplification Method:J. Clin. Microbiol. 31, p3270, 1993)、3SR法(Self Sustained sequence Replication Reactions:Proc. Nat. Acad. Sci., USA 87, p1874-1878, 1990)、CPR法(特許第2691177号公報)などが挙げられ、いずれの方法においても適用することが可能である。

【0015】本発明において、増幅された核酸を検出する方法としては、特に限定されるものではないが、公知の方法により行うのが好ましい。例えば、放射性同位元素、酵素及び蛍光物質等を用いて行うのが好ましい。その方法としては、一般的な核酸ハイブリダイゼーション法、核酸特異抗体を用いたELISA等の方法を用いることが可能である。核酸ハイブリダイゼーション法にはナイロン膜に増幅核酸を結合させ、標識プローブにより検出する方法や、補足プローブを担体に結合させておき、検出プローブでサンドイッチする方法や、核酸特異抗体を用いてサンドイッチする方法がある。さらには2本鎖を形成したときに特異的に蛍光を発する色素やプローブを用いることにより、恒温核酸増幅反応と同時に検出することも可能である。また、増幅反応と同時に検出

する方法としては、蛍光団と、消光団を標識したプローブを用いる方法も可能である。

【0016】

【実施例】以下に、本発明の実施例を例示することによって、本発明の効果をより一層明確なものとする。

【0017】実施例1 核酸標識した抗体を用いることによるヒトIgG測定の高感度検出

(1) ビオチン化標識核酸の合成

パーキンエルマー社DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号1に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、プライマー1と呼ぶ）および配列番号2に示される塩基配列を有するビオチン化オリゴヌクレオチド（以下、プライマー2と呼ぶ）を合成した。

【0018】プライマー1は、増幅対象となる核酸に相補的な配列（20ヌクレオチド）の5'側に、T7プロモーター配列（27ヌクレオチド）を連結している。合成は上記装置のマニュアルに従い、各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55℃、一夜実施した。オリゴヌクレオチドの精製はファルマシア社製FPLCで陰イオン交換カラムにて実施した。

【0019】プライマー2は、増幅対象となる核酸に相補的な配列（20ヌクレオチド）の5'側に、ビオチンを連結している。ビオチンの結合はパーキンエルマー社製の、ビオチンアミダイトを用いて行った。合成はそのマニュアルに従い、各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55℃、一夜実施した。オリゴヌクレオチドの精製はHPLCにより、逆相カラム（ファルマシア製Resource RPC）を用いて実施した。

【0020】増幅対象となる核酸を含むcDNAを鋳型として、前記プライマー1及び前記プライマー2を用いてPCR反応を行いビオチン化標識を作製した。PCR反応は以下の条件で行った。

【0021】反応液

トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.9)	10 mM
MgCl ₂	1.5 mM
牛血清アルブミン	500 μg/ml
コール酸ナトリウム	0.1%
TritonX-100	0.1%
dNTP	0.2 mM
プライマー1	0.2 μM
プライマー2	0.2 μM
Tth DNAポリメラーゼ	4 U
標的核酸	0.1 ng

【0022】増幅サイクル

変性	94℃、1分
アニール	55℃、2分
伸長	72℃、1.5分
30サイクル	

【0023】(2) ビオチン標識核酸の精製

上記増幅反応が成功したことを、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行って確認した後、増幅反応液を直接QIAGEN社のQIAquick PCR purification kitsを用いて精製し、吸光度を測定して濃度を計算した。

【0024】(3) 捕捉抗体のマイクロタイタープレートへの結合とブロッキング

ウサギ抗ヒトIgG抗体(DAKO製、Cat. No. A0423)を0.05 N NaHCO₃で、8000倍に希釈し、マイクロタイタープレート(MicroFLUOR B、ダイナテック社)に各50 μlずつ分注し、4℃で一晩放置した。その後、3%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液(PBS (-))に置換して、非特異反応を抑えるためのブロッキングを37℃で1時間程度行った。

【0025】(4) 抗原抗体反応

上記(3)で作成したマイクロタイタープレートのブロッキング溶液を除去した後、ヒトIgG(DAKO製、Cat. No. X0593)を1%牛血清アルブミン含有PBS (-)で、50 pg/ml、5 pg/ml、0.5 pg/ml、0.05 pg/ml及び0 pg/mlの各濃度の希釈溶液を作成し、各濃度の希釈液100 μlを添加し、37℃で2時間反応させた。

【0026】(5) 標識抗体の反応

上記(4)で反応したマイクロタイタープレートを0.025% Tween20含有PBS (-)で3回洗浄した後、2000倍に希釈したビオチン標識抗体(DAKO製、Cat. No. E0482)を100 μl添加して、37℃で2時間反応させた。

【0027】(6) ストレプトアビシン反応

(5)で反応したマイクロタイタープレートを0.025% Tween20含有PBS (-)で3回洗浄した後、1 μg/ml濃度のストレプトアビシン溶液100 μlを添加し、37℃で15分反応させた。

【0028】(6)で反応したマイクロタイタープレートを0.025% Tween20含有PBS (-)で3回洗浄した後、核酸標識群は、(2)で調製したビオチン標識核酸を10³分子/mlに調製し、100 μlを添加し、37℃で15分反応させた。一方、比較例として、酵素標識を用いたアッセイ系についても検討を行った。酵素標識群は、0.5 μg/ml濃度のビオチン標識アルカリフェヌルアーティゼ100 μlを添加し、37℃で15分反応させた。

【0029】(7) 標識核酸の増幅

上記(6)で、核酸標識抗体で反応させたマイクロタイタープレートを、0.025% Tween20含有PBS (-)で3回洗浄した後、NASBA法により、標識核酸の増幅を行った。NASBA法は以下の反応液を添加し、41℃で90分間保温することにより行った。

【0030】反応液

トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)	40 mM
MgCl ₂	12 mM
牛血清アルブミン	1 mg/ml

塩化カリウム	7.0 mM
D T T	5 mM
d N T P	1 mM
r N T P	2 mM
プライマー1	0.2 μM
非ビオチン化プライマー2	0.2 μM
AMV逆転写酵素	7.5 U
R N a s e H	0.08 U
RNAポリメラーゼ	20 U

【0031】(8) 増幅核酸の検出

増幅核酸の検出はマイクロプレートを用いたサンドイッチハイブリダイゼーション法により行った（特願平9-133553号）。

【0032】(9) アルカリフォスファターゼ標識の検出

上記（6）で、アルカリフォスファターゼ標識抗体で反応させたプレートを、0.025% Tween20含有P B S（-）で3回洗浄した後、アルカリ性ホスファターゼの発光基質であるジオキセタン化合物（商品名：Lumiphos 480、Lumigen社）100 μlを注入し、37℃で15分間保温後に暗室中でホトンカウンター（浜松ホトニクス社）で発光量を測定した。

【0033】(10) 核酸標識した抗体を用いることによるヒトIgG測定の高感度検出検討結果

上記（8）及び（9）において検出されたヒトIgGの検出結果を表1に示す。表中の数値は発光量（cps；cou

配列番号：1

配列の長さ：47

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..47

特徴を決定した方法：S

他の特徴：ヒト型結核菌（Mycobacterium tuberculosis）16S rRNA遺伝子の配列と相補的な配列を有する

配列

AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGCTA CCCGTCGTCG CCTTGGT

47

【0038】

配列番号：2

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..21

特徴を決定した方法：S

他の特徴：ヒト型結核菌（Mycobacterium tuberculosis）16S rRNA遺伝子の配

nt/second) で表示されている。

【0034】

【表1】

抗原量	酵素標識法		核酸標識法		
	0pg/ml	1372	1544	70	90
0.005pg/ml	1520	1122	90	80	
0.05pg/ml	1148	1648	90	70	
0.5pg/ml	1300	1484	56800	44940	
5pg/ml	1738	1790	80090	73520	
50pg/ml	36762	33698	152120	105130	

【0034】表1は、酵素標識法と核酸標識法を比較して、核酸標識抗体を用いて増幅、検出した場合は、検出感度が著しく上昇している。結論として、核酸標識した抗体を用いることにより抗原抗体反応の高感度化に絶大な効果を発揮するものと考えられる。

【0036】

【発明の効果】上述したように、本発明における生体試料中に含まれる成分を免疫学的検出もしくは定量する免疫学的測定法に関し、増幅されうる核酸により標識し、該標識核酸を標的核酸として恒温増幅反応を行うことにより得られた増幅核酸を検出することにより、温度サイクルのための特別な機器を必要とせず、また抗原抗体反応を損なうこともない比較的マイルドな条件による免疫学的測定法の簡便かつ迅速で、しかも高感度な方法を実現するものである。

【0037】

【配列表】

列と相補的な配列を有する
配列

GGAAAGGTCT CTTCGGAGAT A

21